

B39



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 32 946 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 101 32 946.6
⑳ Anmeldetag: 6. 7. 2001
㉑ Offenlegungstag: 16. 1. 2003

㉒ Int. Cl. 7:
C 12 N 15/31
C 12 N 15/63
C 12 N 1/21
C 07 C 229/22
C 12 P 13/04
C 12 P 13/08
// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:01)

DE 101 32 946 A 1

㉓ Anmelder:
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

㉔ Erfinder:
Rieping, Mechthild, Dr., 33619 Bielefeld, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉕ Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae
- ㉖ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:
- Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF, oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,
 - Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - Isolierung der gewünschten L-Aminosäure.

BEST AVAILABLE COPY

DE 101 32 946 A 1

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF, verstärkt wird (werden).

Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z. B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Threonin produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens eine oder mehrere der für die Gene dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF kodierende(n) Nukleotidsequenz(en) verstärkt wird (werden).

[0008] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0009] Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0010] Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

[0011] Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF, verstärkt wird (werden),
- Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben.

[0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

[0013] Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

Escherichia coli TF427
Escherichia coli H4578
Escherichia coli KY10935
Escherichia coli VNIIGenetika MG442
Escherichia coli VNIIGenetika M1
Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
Escherichia coli BKIM B-3996
Escherichia coli kat 13
Escherichia coli KCCM-10132.

[0014] Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

Serratia marcescens HNr21
Serratia marcescens TLR156
Serratia marcescens T2000.

[0015] L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylse-

rin, Resistenz gegen Diaminobornsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

[0016] Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

[0017] Die Nukleotidsequenzen der Gene von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden.

dps-Gen:
Bezeichnung:
Globaler Regulator, Hungerbedingungen, DNA Bindeprotein
Referenz:
Almiron et al.; Genes & Development 6(12B), 2646-54 (1992)
Accession No.:
AE000183
Alternative Gennamen:
pexB, vtm

hns-Gen:
Bezeichnung:
DNA-Bindeprotein HLP-II (HU, BH2, HD, NS); Pleiotroper Regulator (Histon-artiges Protein)
Referenz:
Pon et al.; Molecular and General Genetics 212(2), 199-202 (1988)
Accession No.:
AE000222
Alternative Gennamen:
bglY, cur, drc, drdX, drs, fimG, mysA, osmZ, pilG, topX, virR

lrp-Gen:
Bezeichnung:

Regulator für das Leucin-Regulon und hochaffine Transportsysteme verzweigtkettiger Aminosäuren (leucine-responsive regulatory protein)
Referenz:

- 5 Willins et al.; Journal of Biological Chemistry 266(17), 10768-74 (1991)
Accession No.:
AE000191
Alternative Gennamen:
10 ihb, livR, lss, lsrR, oppl, rblA, mbf

pgm-Gen:
Bezeichnung:
Phosphoglucumutase

- 15 EC-Nr.:
5.4.2.2
Referenz:
Lu und Kleckner, Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)
Accession No.:
AE000172

fba-Gen:
Bezeichnung:
25 Fructose Bisphosphat Aldolase (Klasse II)

- EC-Nr.:
4.1.2.13
Referenz:
Alefounder et al., Biochemical Journal 257: 529-34 (1989)
Accession No.:
30 AE000376
Alternative Gennamen:
fda, ald

- 35 ptsG-Gen:
Bezeichnung:
PTS System, Glucose-spezifische IIBC-Komponente
Referenz:
Erni und Zanolari; Journal of Biological Chemistry 261(35),
40 16398-403 (1986)
Accession No.:
AE000210
Alternative Gennamen:
CR, car, cat, gpt, umg

- 45 ptsH-Gen:
Bezeichnung:
PTS-System, Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase
50 EC-Nr.:
2.7.1.69
Referenz:
Saffen et al.; Journal of Biological Chemistry 262(33), 16241-53 (1987)
Accession No.:
55 AE000329
Alternative Gennamen:
ctr, hpr

- ptsI-Gen:
Bezeichnung:
60 PEP-Protein PTS Enzym I
EC-Nr.:
2.7.3.9
Referenz:
65 Saffen et al.; Journal of Biological Chemistry 262(33), 16241-53 (1987)
Accession No.:
AE000329

Alternative Gennamen:
ctr

crr-Gen:
Bezeichnung:
PTS System, Glucose-spezifische IIA Komponente (Phosphocarrier Protein für Glucose)
Referenz:
Saffen et al.; Journal of Biological Chemistry 262(33), 16241-53 (1987)
Accession No.:
AE000329
Alternative Gennamen:
gsr, iex, tgs, tre

mopB-Gen:
Bezeichnung:
GroES, 10 Kd Chaperon, bindet an Hsp60 in Gegenwart von Mg-ATP, supprimiert die ATPase-Aktivität
Referenz:
Chandrasekhar et al.; Journal of Biological Chemistry 261(26), 12414-9 (1986)
Accession No.:
AE000487
Alternative Gennamen:
groE, groES, hdh, tabE

ahpC-Gen:
Bezeichnung:
Alkyl Hydroperoxid Reductase, C22 Untereinheit; Detoxifizierung von Hydroperoxiden
EC-Nr.:
1.6.4.-
Referenz:
Ferrante et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 (17): 7617-21 (1995)
Accession No.:
AE000166

ahpF-Gen:
Bezeichnung:
Alkyl Hydroperoxid Reductase, F52a Untereinheit; Detoxifizierung von Hydroperoxiden
Referenz:
Ferrante et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 (17): 7617-21 (1995)
Accession No.:
AE000166

[0018] Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

[0019] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen ("sense mutations") ergeben.
[0020] Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften der Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
[0021] Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es

kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0022] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0023] In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z. B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102, 75-78 (1991)), pTrec99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopE, ahpC und ahpF oder dafür codierende Nucleotidsequenzen trägt.

[0024] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0025] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopB, ahpC und ahpF, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

[0026] So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende, pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231: 332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende, ppc-Gen (Molecular and General Genetics 231: 332 (1992)),

rende ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),
 - die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
 - das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
 - das für die Malat: Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (DE 100 34 833.5),
 - das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
 - das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen von *Corynebacterium glutamicum* (DE 100 26 494.8), und
 - das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983) Gene 23: 199-209 (1983))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0027] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crt, mopE, ahpC und ahpF, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Rávník und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjFA (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yuFP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-7156 (1990))),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (Grabau und Cronan (Nucleic Acids Research 14 (13), 5449-5460 (1986))),
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (Matsuoka und McFadden, Journal of Bacteriology 170, 4528-4536 (1988)),
- das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (Hosono et al., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59, 256-251 (1995)), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist, und
- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (Jahreis et al., Molecular and General Genetics 226, 332-336 (1991)), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

[0028] Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein)

oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0029] Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

[0030] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crt, mopB, ahpC und ahpF, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0031] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch-Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch- (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storchas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0032] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

[0033] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0034] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0035] Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0036] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise ein-

gesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plas-
miden können dem Medium geeignete selektiv wirkende
Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Be-
dingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sau-
erstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur
eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die
Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-
Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel
wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stun-
den erreicht.

[0037] Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch
Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Nin-
hydrin-Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al.
(Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder
sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei
Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51:
1167-1174) beschrieben.

[0038] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fer-
mentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispiels-
weise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-
Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, **dadurch gekenn-**
zeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Amino-
säure produzierenden Mikroorganismen der Fa-
milie Enterobacteriaceae, in denen man eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
dps, hns, lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr,
mopE, ahpC und ahpF, oder dafür kodierende Nu-
kleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überex-
primiert,
 - b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure
im Medium oder in den Zellen der Mikroorganis-
men, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure
wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermenta-
tionsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Ge-
samtheit oder Anteilen (> 0 bis 100) davon im
Produkt verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen
man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges
der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen
die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschal-
tet sind, die die Bildung der gewünschten L-Amino-
säure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die Expression des (der) Polynu-
kleotides(e), das(die) für eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe dps, hns, lrp, pgm, fba,
ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopE, ahpC und ahpF, kodiert
(kodieren) erhöht.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die regulatorischen und/oder kataly-
tischen Eigenschaften der Polypeptide (Proteine) ver-
bessert oder erhöht, für die die Polynukleotide dps, hns,
lrp, pgm, fba, ptsG, ptsH, ptsI, crr, mopE, ahpC und
ahpF kodieren.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-

zeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren
Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fer-
mentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-De-
hydrogenase, die Homoserinkinase und die
Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
- 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende
pyc-Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase ko-
dierende pps-Gen,
- 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden
Gene pntA und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen
rhtB,
- 6.7 das für die Malat : Chinon Oxidoreduktase ko-
dierende mqo-Gen,
- 6.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
und
- 6.9 das für den Threoninexport kodierende thrE-
Gen,
- 6.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodie-
rende gdhA-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren
Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fer-
mentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodie-
rende tdb-Gen,
- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende
mdh-Gen,
- 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens
(orf) yjfa,
- 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens
(orf) ytfp,
- 7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxy-
kinase kodierende pckA-Gen,
- 7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-
Gen,
- 7.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-
Gen,
- 7.8 das für den DgsA-Regulator des Phospho-
transferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 7.9 das für den Fructose-Repressor kodierende
fruR-Gen,

abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expres-
sion verringert.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.